



EP99/8847

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

EPO - Munic
24

18. Feb. 20

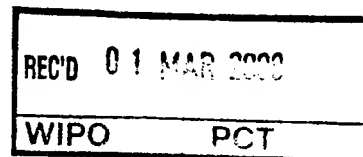
4



INV. INT.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. MI98 A 002491



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li

TEGUENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

D.ssa Paola Di GINTIO

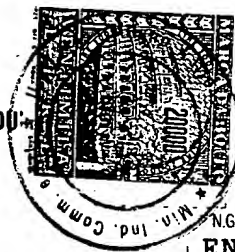
Paola Di Gintio

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL' ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MOD. 1



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR** **EN**
 Residenza **Milano** codice **03064280153**

2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza **Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.**
 via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) _____ gruppo/sottogruppo _____

"Metodo di quantificazione di acidi nucleici"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Locatelli Giuseppe** 3) **Malnati Mauro**
 2) **Lusso Paolo** 4) **Salvatori Francesca**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
 2) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

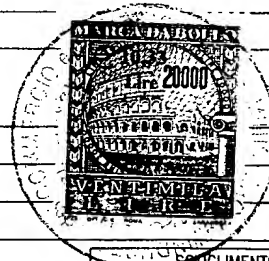
Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **24** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) **2** **PROV** n. tav. **06** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
 Doc. 3) **0** **NE** lettera d'incarico, procura e intermittenza procura generale **XXXXXXXXXXXX**
 Doc. 4) **0** **RIS** designazione inventore
 Doc. 5) **0** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) **0** **RIS** autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire **Cinquecentosessantacinquemila#** obbligatorio

COMPILATO IL **17/11/1998** FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) **Banfi Paolo**

CONTINUA SI/NO **SI**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**



SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

confronta singole priorità

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI **MILANO** codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **MI98A 002491** Reg. A.

L'anno millenovecento **NOVANTOTTO**, il giorno **DICIASSETTE**, del mese di **NOVEMBRE**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **01** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01 di totali 01

DOMANDA N.

REG. A

M198A

2491

A. RICHIEDENTE (I)

N.C.

Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

05	Scarlatti Gabriella	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Banfi Paolo

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

1198 A002491

REG. A

DATA DI DEPOSITO

17/11/1998

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

D. TITOLO

"Metodo di quantificazione di acidi nucleici"

L. RIASSUNTO

Viene descritto un metodo di quantificazione di acidi nucleici basato sull'uso di un calibratore, di opportuni primer e sonde e di una polimerasi di acido nucleico con attività 5'-3' nucleasica.



M. DISEGNO

INSERTO DEL PLASMIDE STANDARD

CAACGACAA AGCCAAATTA TCCAGAGCGG CATCGATATT TRACTTTGTT 400
GTTTGCTGTT TCGGTTTAAAT AGGTCTCGCC GTAGCTATTA ATTGAACAA

A

TTTTTTTcac cagacgtcac acccgaggga atAACGCTCG TCACAAACAT 450
AAAAAAAgtg gctgcagtg tgggttctct taTTGCGAGC AGTGTITGTA

AAATTCTGT GTAGGCGTTT CGATCATCCT CAACCTAGCG CTCGGGGCTG 500
TTTTAGACA CATCCGCAAA GCTAGTAGGA GTTGATCGC GAGCCCCGAC

INSERTO DEL PLASMIDE CALIBRATORE

CAACGACAA AGCCAAATTA TCCAGAGCGG CATCGATATT TRACTTTGTT 400
GTTTGCTGTT TCGGTTTAAAT AGGTCTCGCC GTAGCTATTA ATTGAACAA

B

TTTTTTTtac gcaacgcccac cagacctagc gaAACGCTCG TCACAAACAT 450
AAAAAAAtg cgttgcgggt gctggatcg ctTTGCGAGC AGTGTITGTA

AAATTCTGT GTAGGCGTTT CGATCATCCT CAACCTAGCG CTCGGGGCTG 500
TTTTAGACA CATCCGCAAA GCTAGTAGGA GTTGATCGC GAGCCCCGAC

Fig.1

5668 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/as "METODO DI QUANTIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI"

17 NOV. 1998

a nome : FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR

con sede in: Milano

MI98A002491

* *

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per la quantificazione assoluta di acidi nucleici presenti in un campione costituito da fluido biologico.

Il metodo dell'invenzione viene convenientemente applicato nella diagnostica virologica e di qualsiasi altro agente patogeno.

STATO DELLA TECNICA

Una strategia comunemente utilizzata per rilevare la presenza di agenti patogeni, limitatamente ai fluidi biologici, è l'individuazione di un antigene (metodo diretto) o di un anticorpo relativo (metodo indiretto). Tale strategia, che si applica con tecniche immunometriche di tipo ELISA, IFA o Western Blotting, è però limitata da scarsa accuratezza, precisione e sensibilità della quantificazione, dalla cross-reattività di anticorpi diversi e dalla impossibilità di fornire diagnosi precoci.

Un altro tipo di approccio è basato sul rilevamento di acidi nucleici, specifici per ogni particolare tipo di patogeno e da ogni possibile fonte biologica, sfruttando il sistema di amplificazione mediante reazione polimerasica a

catena (PCR). Tale tecnica, nella sua versione più sofisticata, la PCR competitiva quantitativa (qcPCR), consente di raggiungere un'elevata sensibilità ed una misurazione quantitativa abbastanza accurata, nonché di ottenere la diagnosi in tempi brevi dal contatto del paziente con l'agente patogeno. La precisione ed accuratezza di questo sistema è però assicurata entro un intervallo di quantificazione ristretto, che costringe l'operatore a moltiplicare il numero delle repliche del campione da determinare (tipicamente 8); inoltre sono richiesti tempi e costi ulteriori per i passaggi connessi alle procedure di rilevamento del prodotto amplificato.

I primi sistemi che hanno permesso di seguire le cinetiche di PCR in tempo reale si basavano sull'utilizzo di un intercalante come il bromuro di etidio, che si lega al DNA a doppia elica in via di polimerizzazione aumentando proporzionalmente il proprio segnale di fluorescenza, in risposta a un eccitamento con raggi UV; in un termociclatore adattato per irradiare i campioni con raggi UV, la fluorescenza emessa dalle molecole di etidio intercalate veniva registrata con una CCD camera e messa in grafico contro il numero di cicli di amplificazione (Higuchi et al., Biotechnology 10: 413-417). Il principale limite di tale tecnica era però che il segnale veniva generato anche dai prodotti non specifici della PCR.

Successivamente, è stata introdotta la metodica nota come TaqMan, descritta in US 5210015. Tale metodica è basata sulla rilevazione in tempo reale della fluorescenza generata dalla degradazione da parte dell'enzima Taq polimerasi di un probe marcato che si ibrida specificamente al segmento da amplificare, in rapporto diretto con il prodotto di PCR in formazione. Nella miscela della reazione di PCR è infatti presente un oligonucleotide sonda ("probe") non estendibile, marcato con due molecole fluorescenti, un "reporter" posto all'estremità 5' del probe ed un "quencher" posto all'estremità 3' dello stesso; la sequenza del "probe" deve essere complementare ad una regione del DNA in esame situata tra i due siti di appaiamento degli oligonucleotidi primer. Durante la reazione di amplificazione della PCR, l'enzima Taq Polimerasi, innescato specificamente dai primer, inizia a duplicare il DNA in esame; quando l'enzima incontra il probe appaiato a tale DNA, lo taglia con la propria attività 5' nucleasica, ne causa la rimozione con la conseguente separazione delle molecole fluorescenti; l'emissione del fluorocromo reporter diviene dunque misurabile e, dato che ogni molecola di DNA duplicata durante la PCR è accompagnata dal rilascio di una molecola di "reporter", la fluorescenza totale nel campione è, in ogni momento, proporzionale alla quantità di DNA amplificato. Il "Sequence Detection System" 7700 ABI PRISM (prodotto e distribuito da Perkin Elmer) è in

grado di fungere sia da amplificatore di DNA sia da collettore dei segnali di fluorescenza dei campioni lungo tutto il corso della reazione di PCR. Questi segnali vengono poi elaborati da un software, che è in grado di estrapolare la quantità iniziale di DNA dei campioni analizzati, partendo da una curva standard costruita con i segnali di fluorescenza di campioni a contenuto di DNA noto. E' da notare che tale sistema possiede due livelli di specificità: l'appaiamento specifico dei primer e l'appaiamento specifico del probe.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato, e ciò costituisce l'oggetto della presente invenzione, un metodo applicabile in generale alle tecniche di quantificazione di acidi nucleici basate sull'attività polimerasica e 5' nucleasica di polimerasi di acido nucleico, che permette di migliorare l'efficienza delle tecniche stesse, con un'aumentata sensibilità, accuratezza e precisione e una ridotta variabilità delle misurazioni, grazie al controllo esercitato anche nella fase di manipolazione del campione biologico.

Il metodo dell'invenzione sfrutta la presenza di un calibratore, sin dalla fase di estrazione del campione, durante l'amplificazione dell'acido nucleico bersaglio e durante la seguente rivelazione con opportune sonde in grado di ibridarsi o al solo calibratore o alla sola sequenza bersaglio.



Il metodo dell'invenzione può essere applicato a qualsiasi quantificazione assoluta di acidi nucleici presenti in diversi fluidi biologici, per esempio alla quantificazione di agenti patogeni virali o batterici nei liquidi corporei (liquor, urine, plasma, siero, liquido sinoviale) o alla quantificazione di contaminanti alimentari o ambientali.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Le tecniche di quantificazione di acidi nucleici che sfruttano l'attività polimerasica e 5'nucleasica delle polimerasi di acido nucleico prevedono l'estrazione degli acidi nucleici dal campione, la preparazione di una miscela di reazione che contiene i primer specifici per la sequenza bersaglio, una sonda specifica per una regione della sequenza bersaglio compresa tra le regioni complementari ai due primer, detta sonda essendo marcata con un "reporter", che preferibilmente è un fluorocromo, ed un "quencher", e una polimerasi, a cui segue la determinazione del segnale associato al marcatore "reporter" che viene liberato nella fase di reazione in cui la polimerasi "incontra" il terminale 5' della sonda appaiata all'acido nucleico bersaglio.

Secondo il metodo dell'invenzione, prima dell'estrazione dell'acido nucleico da quantificare (bersaglio), al campione viene aggiunta una quantità nota di acido nucleico templato, che da qui in poi verrà chiamata "calibratore", con sequenza identica a quella dell'acido nucleico bersaglio, eccettuata

la regione complementare alla sonda, che ha sequenza diversa e casuale rispetto alla regione corrispondente sull'acido nucleico bersaglio, ed una T_m (temperatura di "melting") simile, preferibilmente compresa nell'intervallo di più o meno quattro gradi centigradi rispetto alla T_m dell'acido nucleico bersaglio, più preferibilmente di più o meno due gradi centigradi.

Dopo aver eseguito l'estrazione, alla miscela estratta campione-calibratore vengono aggiunti i primer e, separatamente, la sonda complementare all'acido nucleico bersaglio ed una sonda complementare alla sequenza "random" del calibratore, derivatizzata con un "reporter" ed un "quencher", detto "reporter" potendo essere uguale o diverso rispetto al "reporter" della sonda complementare all'acido nucleico bersaglio. Inoltre, viene aggiunta una polimerasi termostabile avente attività 5'-3' nucleasica, dando così inizio alla reazione di polimerizzazione/nucleasica.

La reazione viene condotta in un Sequence Detection System 7700 ABI PRISM in grado di funzionare sia da amplificatore di DNA sia da collettore dei segnali di fluorescenza emessi dai marcatori "reporter" liberati in seguito ad attività nucleasica della polimerasi. In pratica, vengono condotte tre reazioni in parallelo, una in presenza della sonda specifica per l'acido nucleico bersaglio, una in presenza della sonda specifica per il calibratore ed una in

presenza di entrambe le sonde.

La reazione in presenza della sonda specificá per l'acido nucleico bersaglio permette di quantificare il numero di copie di acido nucleico bersaglio estratto (N_o), la reazione in presenza del calibratore permette di quantificare il numero di copie di calibratore recuperate dopo l'estrazione (C_o), la reazione in presenza di entrambe le sonde permette di calcolare il numero totale di templati bersaglio e calibratore (T).

E' possibile quindi calcolare la resa percentuale R di recupero del calibratore:

$$R = C_o / C,$$

da cui si ricava il fattore di calibrazione (cal)

$$cal = 1/R$$

e dunque il numero reale di unità di acido nucleico presenti nel campione prima dell'estrazione:

$$N = N_o \times Cal.$$

La relazione

$$T = N_o + C_o$$

assicura che in ogni campione permanga identica l'efficienza di amplificazione del DNA standard e di quello calibratore.

La mancata amplificazione del calibratore permette inoltre di rilevare tutte le diverse forme di falsi negativi (errore tecnico o presenza di inibitori) che rappresentano uno dei problemi più importanti per l'utilizzo di metodiche

di amplificazione in diagnostica clinica.

Le condizioni in cui viene condotta la reazione sono le stesse comunemente adottate nelle reazioni di qPCR (Petrik J. Et al., J. Virol. Methods, 64: 147-159, 1997). Per compensare i fenomeni di competizione le condizioni di reazione possono essere variate, più precisamente possono essere modificate la concentrazione dei primer, la concentrazione dell'enzima polimerasi o il tempo di "annealing"/estensione o la concentrazione di cofattori quali $MgCl_2$.

L'acido nucleico bersaglio può essere DNA o RNA, preferibilmente DNA, mentre i primer e le sonde sono preferibilmente sequenze oligodesossiribonucleotidiche. Nel caso in cui l'acido nucleico bersaglio è RNA, occorre un passaggio preventivo di retrotrascrizione per ottenere il corrispondente DNA. Le sonde comprendono un marcatore "reporter" fluorescente e un marcatore "quencher" in grado di ridurre o annullare la fluorescenza del marcatore "reporter" quando le sonde sono libere in soluzione.

Preferibilmente, dette sonde hanno il terminale 5' posto a una distanza dal terminale 3' del primer "forward" compresa tra 1 e 30 nucleotidi, cioè ad una distanza tale da permettere il rilascio del marcatore "reporter" in assenza di polimerizzazione di acido nucleico. Inoltre, preferibilmente le sonde hanno il terminale 3' bloccato per prevenire

quello amplificato dai primer per HHV-6, eccettuata la regione complementare alla sonda, che è stata modificata in modo da mantenerne la stessa composizione nucleotidica, ma con una sequenza "random", e la stessa temperatura di "melting" (T_m); il plasmide prodotto, denominato "calibratore", viene amplificato dagli stessi primer e con la stessa cinetica del plasmide standard, ma viene riconosciuto dal software del 7700 solo se la miscela di PCR contiene una sonda con sequenza complementare a quella "random".

Il plasmide calibratore è stato espanso e quantificato accuratamente allo spettrofotometro in modo da poterne aggiungere una quantità precisa ai campioni da estrarre. Dopo l'estrazione del DNA, i campioni contengono pertanto un determinato numero di genomi di HHV-6 e di copie di plasmide calibratore, che è legato alla resa di tale estrazione; assumendo che tale resa sia identica per le due specie molecolari, è possibile dunque calibrare la quantificazione del DNA di HHV-6.

Le condizioni specifiche di svolgimento della reazione sono indicate con maggior dettaglio nella sezione esempi.

Per compensare i fenomeni di competizione le condizioni di reazione sono state così modificate: la concentrazione dei primer è stata decuplicata, la concentrazione dell'enzima è stata raddoppiata, il tempo di annealing/estensione della fase di amplificazione è stato aumentato di 8 secondi a ciclo

a partire da secondi iniziali. I fenomeni di competizione tra i due tati hanno comunque ristretto l'intervallo di quantificaz assoluta (calibrata) da 7 a 5 ordini di grandezza, al di sopra e due al di sotto del valore C, mentre pne invariato il range dinamico della quantificaz relativa (non calibrata) e la capacità di rilevare lsi negativi sperimentali.

Gli ampi che seguono illustrano l'invenzione in maggior aglio.

ESEMPI

Esempio

Scelta e preparazione delle sequenze di HHV-6, HHV-8 e HIV

La clone U67 di HHV-6 (variante A, Genbank accession No. X83) e la regione orf 26 di HHV-8 (Chang et al., Science, 1865-1869, 1994) sono state sottoposte ad una analisi sequenza per individuare le regioni più adatte all'applicazione del sistema TaqMan, utilizzando il programma Primer Express (Perkin Elmer). Le sequenze identificate per il virus HHV-6 (acido nucleico bersaglio o standard) sono riportate in tabella 2 (e fig. 1A e 1B), mentre le sequenze identificate per il virus HHV-8 sono riportate in tabella 1.

La sequenza del probe nel calibratore, sia per HHV-6 che per HHV-8, stata disegnata mediante randomizzazione della regione del probe dello standard, mantenendone:

- 1) La stessa composizione in basi (G+C/A+T) dello standard

- 2) Una Tm uguale (calcolata mediante software Perkin Elmer)
- 3) Una lunghezza uguale (per avere stessa efficienza di amplificazione)
- 4) ed essendo caratterizzata da un assoluta mancanza di omologia con lo standard per evitare cross-ibridazione ed interferenze.

Tabella 1

Sistema di primers e sonde per il virus HHV-8 (5'-3')

Primers	Sonde
Forward 5' -GTCCAGACGATATGTGCGC-3'	Standard CATTGGTGGTATATAGATCAAGTTCCGCCA
Reverse 5' -ACTCCAAAATATCGGCCGG-3'	Calibratore ACTATTCCATGCGGAATTCGAGCATAGTTG

Tabella 2

Sistema di primers e sonde per il virus HHV-6 (5'-3')

Primers	Sonde
Forward 5' CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG3'	Standard 5' CACCAGACGTCACACCCGAAGGAAT3'
Reverse 5' CGCTAGGTTGAGGATGATCGA3'	Calibratore 5' TACGCAACGCCAACAGACCTAGCGA3'

HIV

Mediante l'analisi in banca dati delle sequenze genomiche dei diversi sottotipi di HIV-1 abbiamo selezionato

una sequenza mappata tra la regione LTR e gag conservata in tutti i sottotipi, utilizzando il programma Blast 2.0 (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410). La regione così identificata é mappata dalla posizione 684 alla posizione 810 utilizzando quale sequenza di riferimento la sequenza nucleotidica di HXB2CG (Accession number: K03455, GenBank).

Esempio 2

Clonazione e preparazione dello Standard (acido nucleico bersaglio) e del Calibratore per HHV-6.

I frammenti utilizzati per la costruzione del DNA standard e del DNA calibratore nel sistema di rilevamento del virus HHV-6 sono schematicamente rappresentati in figura 1 (rispettivamente 1-A e 1-B).

La sequenza del frammento Standard è stata ottenuta tramite amplificazione del DNA virale del ceppo GS di HHV-6 e successiva clonazione in vettore plasmidico pCRII (Invitrogen). Il Frammento calibratore (133 bp) è stato sintetizzato chimicamente con un Oligosynthetizer (Perkin Elmer), e successivamente clonato nello stesso vettore sopra menzionato. Entrambi I frammenti sono stati interamente sequenziati dopo clonaggio per verificare i) l'identità (la colinearità) del frammento standard con il DNA virale originario ii) l'identità del frammento calibratore con la

sequenza disegnata artificialmente.

Come evidenziato in figura 1, le frecce, orientate secondo la direzione di trascrizione, indicano le sequenze oligonucleotidiche utilizzate come primers. Il tratteggio individua in entrambi i costrutti le regioni di 25 nucleotidi utilizzate come probes (in carattere minuscolo) che differenziano i due costrutti, identici nella sequenza per i rimanenti 108 nucleotidi. Queste due regioni, pur possedendo la stessa composizione in basi ed una T_m molto simile, sono state disegnate in maniera da costituire un sistema eterologo, che permette di annullare o minimizzare i fenomeni di cross-ibridazione fra i probes impiegati per la rilevazione fluorimetrica specifica e i due frammenti standard e calibratore.

Esempio 3

Validazione del sistema calibratore/standard per HHV6

Assenza di cross-ibridazione

Abbiamo quindi verificato sperimentalmente l'assenza di segnali spurii dovuti a cross ibridazione. Concentrazioni crescenti del frammento standard e calibratore (da 101 a 106 copie di plasmide per reazione di PCR) sono state misurate utilizzando il probe omologo (probe standard per il DNA standard, probe calibratore per il DNA calibratore) od il probe eterologo (probe standard per il DNA calibratore, probe calibratore per il DNA standard). Come evidenziato in figura

2.B il rilevamento delle diverse quantità di templatato impiegando il probe omologo al frammento da misurare, dove a) indica la curva di amplificazione dello standard e b) indica la curva del calibratore, avviene per entrambi i costrutti con cinetiche sovrapponibili (Curve 1-5, a,b) indicando inoltre che l'amplificazione del templatato è proporzionale al segnale di fluorescenza misurato. L'utilizzo del probe eterologo (fig. 2A) per entrambi i templati non genera un segnale apprezzabile al di sopra del rumore di fondo del sistema.

Co-linearità

La colinearità dell'amplificazione dei due templati è stata misurata comparando le equazioni delle rette di regressione generate dai valori ottenuti come cicli soglia in funzione del numero crescente di copie di templatato utilizzato.

Le equazioni risultanti sono:

$y = 37,804 + -3,4402 \times \text{LOG}(x)$ $R^2 = 1,000$ per l'amplificazione del templatato standard

$y = 38,543 + -3,5019 \times \text{LOG}(x)$ $R^2 = 1,000$ per l'amplificazione del templatato calibratore.

Il rapporto dei coefficienti angolari delle due rette è pari a 1,017 indicando così che i due sistemi sono perfettamente sovrapponibili sia come efficienza di amplificazione che per la dinamica del rilevamento



fluorimetrico.

Range di calibrazione

La co-amplificazione dei due templati nella stessa reazione di PCR si traduce in un'apprezzabile modificazione della curva di amplificazione rilevata dal sistema (fig.3A). Si può infatti apprezzare come per quantità di copie crescenti, 500 copie di calibratore in dose unica coamplificate in presenza di 0, 500, 5.000, 50.000, 500.000 copie dello standard, (rispettivamente da 1a-1e) il segnale fluorescente risulti alterato sia nella cinetica di accumulo sia nella quantità finale di prodotto liberato.

Al ciclo soglia (inserto A') concentrazioni del template standard equivalenti o superiori di un Log (inserto A' - curve 1a-1c) non influenzano l'accuratezza della quantificazione del calibratore. Per concentrazioni superiori (curve 1d,1e) la quantificazione è compromessa (marcato ritardo del ciclo soglia, 1d) o completamente annullata (1e). L'ottimizzazione delle condizioni di PCR, ed in particolare l'azione combinata dell'incremento delle concentrazioni di primers (da 300 nM a 3µM) il raddoppio della concentrazione di enzima (da 0,625 unità a 1,25 unità di AmpliTaq Gold) e l'aumento della lunghezza di ogni singolo ciclo di PCR (incremento di 8 sec a ciclo durante il periodo di appaiamento ed estensione), provoca un sensibile miglioramento della cinetica di accumulo dell'amplificato e della resa finale del segnale di

fluorescenza. B, curve 1a-1e). Al ciclo soglia (inserto B') concentrazioni del template standard sino a 2 Log (50.000 copie) superiori all'input del calibratore, non ne modificano la quantificazione (B' curve 1a-1d). Per concentrazioni superiori (50.000 copie) il segnale fluorimetrico generato dal probe bratore è misurabile, anche se la mancanza di una crescita esponenziale del segnale non consente di poter mantenere un livello accurato di misurazione del calibratore (B' curva).

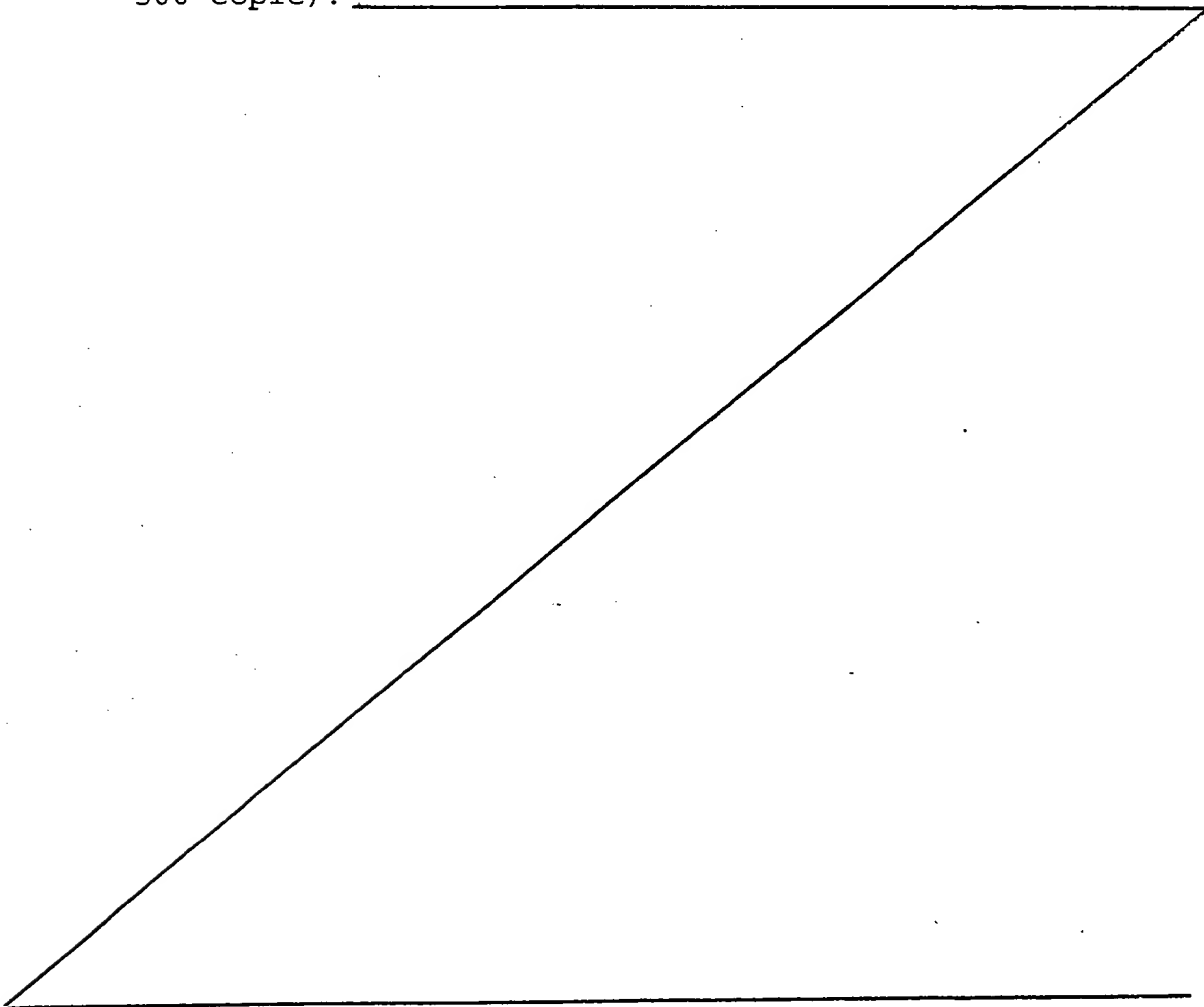
In condizioni rovesciate (fig. 4A), calibratore in eccesso a 2 log di concentrazione sullo standard, es. 500 copie calibratore vs 5 copie standard, l'analisi delle cinetiche di reazione risulta analoga alla precedente. In particolari condizioni ottimizzate, la quantificazione al ciclo soglia (inserto A'; a indica la curva di amplificazione dello standard in assenza del calibratore, b la curva misurata in presenza del calibratore), in questo caso dello standard, viene modificata (A' curve 1a-b: concentrazione dello standard di 100 copie, 2a-b: concentrazione dello standard di 100 copie, 3a-b: concentrazione dello standard di 5 copie).

Grazie a questa ottimizzazione siamo perciò in grado di ottenere una quantificazione accurata di un template di quantità ignote, avendo quali vantaggi pratici:

- 1) Il controllo assoluto (qualitativo e quantitativo)

dell'intero processo di purificazione ed amplificazione
del campione con un range dinamico di almeno 5 log (es
da 5 a 50.000 copie per reazione);

- 2) Il controllo qualitativo sul processo di purificazione e
di amplificazione con un range dinamico di almeno 7
logaritmi (falsi negativi dovuti ad errore tecnico o a
presenza di contaminanti in grado di inibire la reazione
di PCR);
- 3) Eliminazione della diluizione seriale del campione
sconosciuto;
- 4) L'Inserimento di una sola dose nota di calibratore (es
500 copie).



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la quantificazione di "un acido nucleico (bersaglio) in un campione caratterizzato dal fatto di comprendere le seguenti fasi:

- a) l'acido nucleico viene estratto dal campione assieme ad un altro acido nucleico (calibratore) aggiunto precedentemente al campione stesso, detto calibratore avendo la stessa sequenza dell'acido nucleico bersaglio eccettuata una regione, che nell'acido nucleico bersaglio viene ibridata da una sonda marcata con un "reporter" e un "quencher", rispetto alla quale il calibratore ha sequenza nucleotidica diversa e casuale e una T_m simile, e
- b) l'acido nucleico bersaglio e il calibratore estratti vengono miscelati con due primer ("forward" e "reverse") che si appaiano a regioni corrispondenti sull'acido nucleico bersaglio e sul calibratore, con sonde che si appaiano alle diverse regioni dell'acido nucleico bersaglio e del calibratore, come specificato al punto a), dette sonde essendo marcate con un "reporter" ed un "quencher", e con una polimerasi di acido nucleico avente attività 5'-3' nucleasica, in condizioni tali da permettere una reazione di polimerizzazione, e
- c) viene determinato il segnale associato ai "reporter" liberati come conseguenza dell'attività 5' nucleasica



della polimerasi.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta T_m del calibratore è compresa nell'intervallo di più o meno quattro gradi rispetto alla T_m dell'acido nucleico bersaglio.
3. Metodo secondo le rivendicazioni 1-2, caratterizzato dal fatto che il terminale 5' delle sonde dista da 1 a 30 nucleotidi dal terminale 3' del primer "forward".
4. Metodo secondo le rivendicazioni 1-3, caratterizzato dal fatto che le sonde hanno il terminale 3' bloccato per prevenire l'estensione da parte della polimerasi.
5. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti acidi nucleici, dette sonde e detti primer sono sequenze di DNA, e la polimerasi di acido nucleico è DNA polimerasi termostabile avente attività 5'-3' nucleasica.
6. Metodo secondo le rivendicazioni 1-5, caratterizzato dal fatto che le sonde hanno una T_m superiore alla T_m dei primer.
7. Metodo secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che dette sonde comprendono da 18 a 30 nucleotidi.
8. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che dette sonde comprendono un marcatore "reporter" fluorescente e un marcatore "quencher" in grado di ridurre o annullare la fluorescenza del marcatore "reporter" quando le sonde sono libere in soluzione.
9. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni

precedenti, caratterizzato dal fatto che l'acido nucleico bersaglio è acido nucleico genomico dei virus HHV-6, HHV-8 e HIV.

10. Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui il virus è HHV-6, caratterizzato dal fatto che il primer "forward" ha sequenza 5'CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG3', il primer "reverse" ha sequenza 5'CGCTAGGTTGAGGATGATCGA3', la sonda dell'acido nucleico bersaglio ha sequenza 5'CACCAGACGTCACACCCGAAGGAAT3', la sonda del calibratore ha sequenza 5'TACGCAACGCCAACAGACCTAGCGA3'.

11. Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui il virus è HHV-8, caratterizzato dal fatto che il primer "forward" ha sequenza 5'GTCCAGACGATATGTGCGC3', il primer "reverse" ha sequenza 5'ACTCCAAAATATCGGCCGG3', la sonda dell'acido nucleico bersaglio ha sequenza 5'CATTGGTGGTATATAGATCAAGTTCCGCCA3', la sonda del calibratore ha sequenza 5'ACTATTCCATGCGGAATTCGAGCATAGTTG3'.

12. Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui il virus è HIV, caratterizzato dal fatto che le sequenze dei calibratori sono scelte all'interno della regione nucleotidica 684-810 utilizzando quale sequenza di riferimento la sequenza nucleotidica di HXB2CG (Accession Number: K03455, GenBank).

13. Uso di un calibratore e di una sonda corrispondente, come definiti nelle rivendicazioni precedenti, in un metodo per la quantificazione di un acido nucleico in un campione

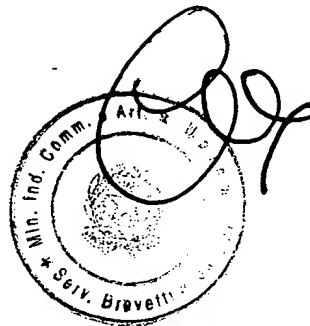
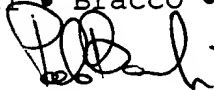
che sfrutta l'attività polimerasica e 5'-3' nucleasica di una polimerasi di acido nucleico.

14. Kit per la quantificazione di un acido nucleico da un campione, comprendente un opportuno calibratore, una sonda specifica per l'acido nucleico bersaglio e una specifica per il calibratore, due primer ("reverse" e "forward") e una polimerasi di acido nucleico termostabile ed avente attività 5'-3' nucleasica.

Milano, 17 novembre 1998

Il Mandatario
(Banfi Paolo)

di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.



F i g. 1

A

INSERTO DEL PLASMIDE CALIBRATORE

CAAACGACAA AGCCAATTAT TCCAGAGCGG CATCGATATT TAACTTGT 400
 GTTGTCTGT TCGGTTAAT AGGCTCGCC GTAGCTATAA ATTGAACAA
 TTTTTTTac gcaacgccaa cagacctagc gaAACGCTCG TCACAACAT 450
 AAAAAAAna catctacata
 AAAATTCTGT GTAGCGTT CGATCATCT CAACCTAGCG CTCGGGGCTG 500
 TTTAAGACA CATCCGAAA GCTAGTAGGA GTGGATCGC GAGCCCCGAC

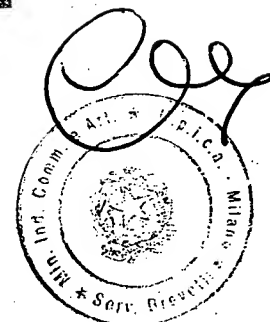
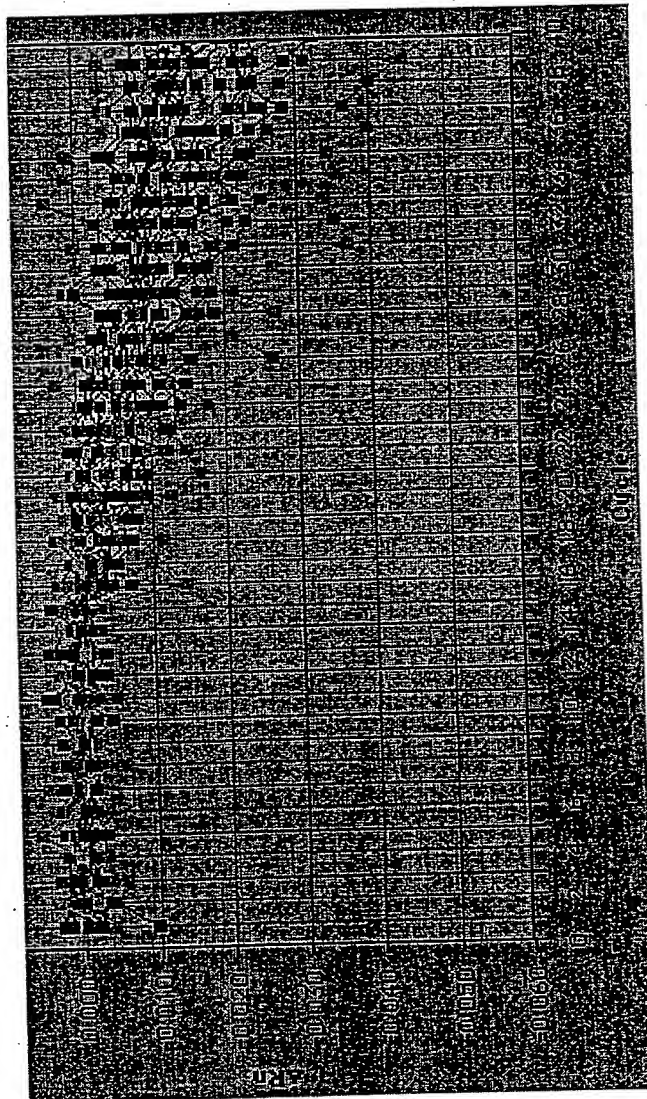


Fig. 2

MI98A002491

1,a-b
2,a-b
3,a-b
4,a-b
5,a-b
6,a-b

A STANDARD CURVE / CALIBRATOR CURVE
+ calibrator probe + standard probe



Il Mandatario
(Prof. Paolo)

Fig. 2

MI 9 8 A 00 2 4 9 1

1-2,a-b
3-4,a-b
5,a-b
6,a-b

B STANDARD CURVE / CALIBRATOR CURVE
+ standard probe + calibrator probe

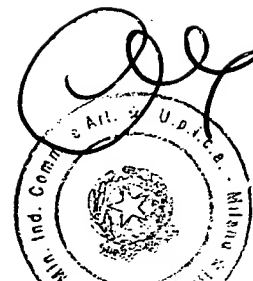
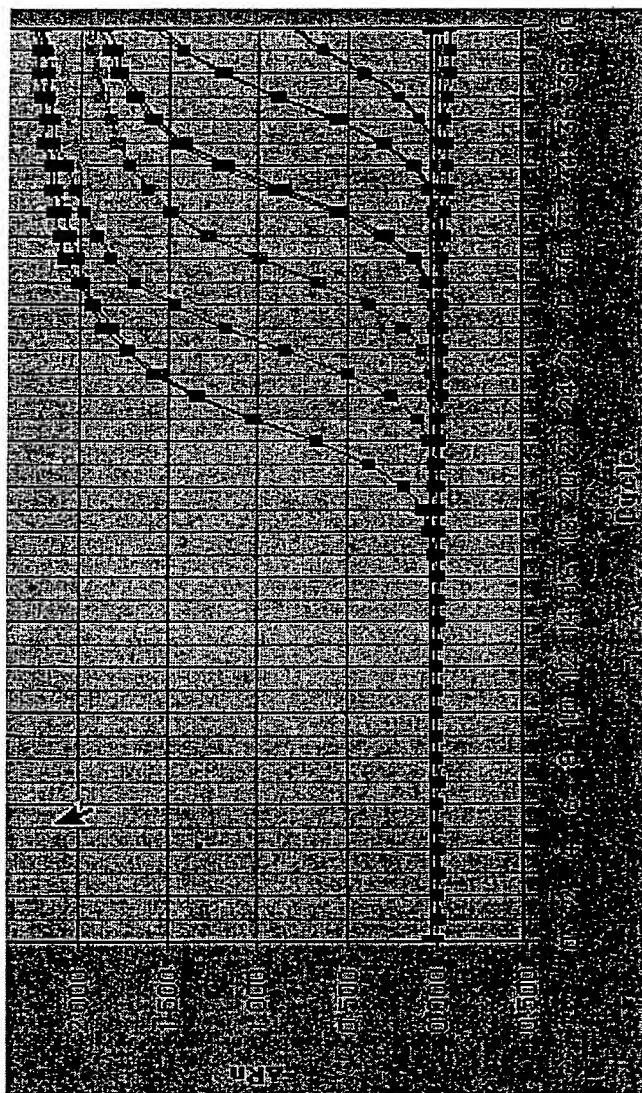


Fig. 3

MI 98 A 00249.1

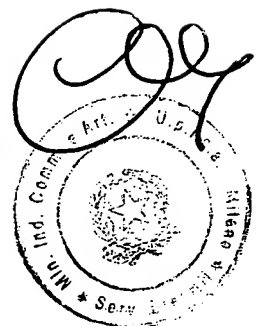
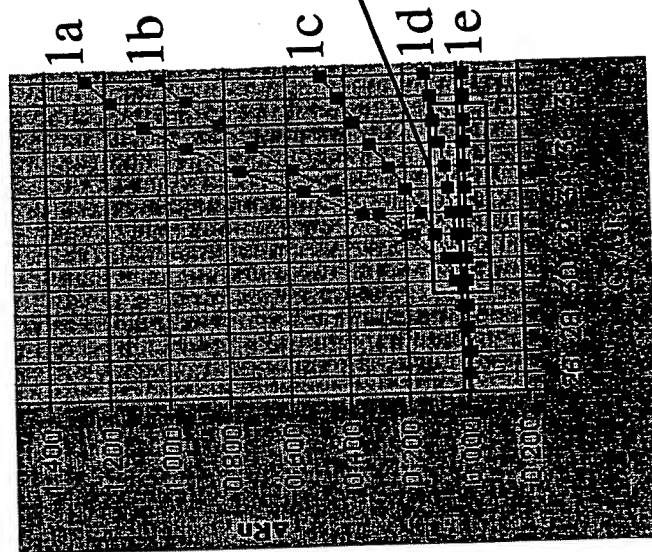
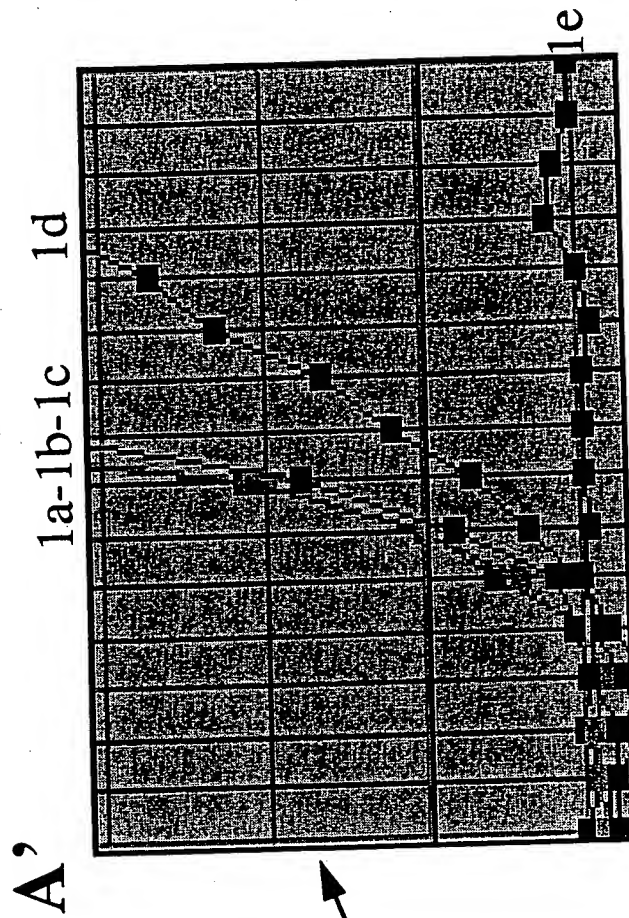


Fig. 3

MIS 8 A 002491

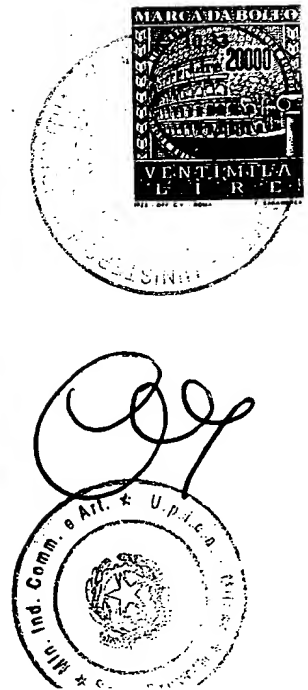
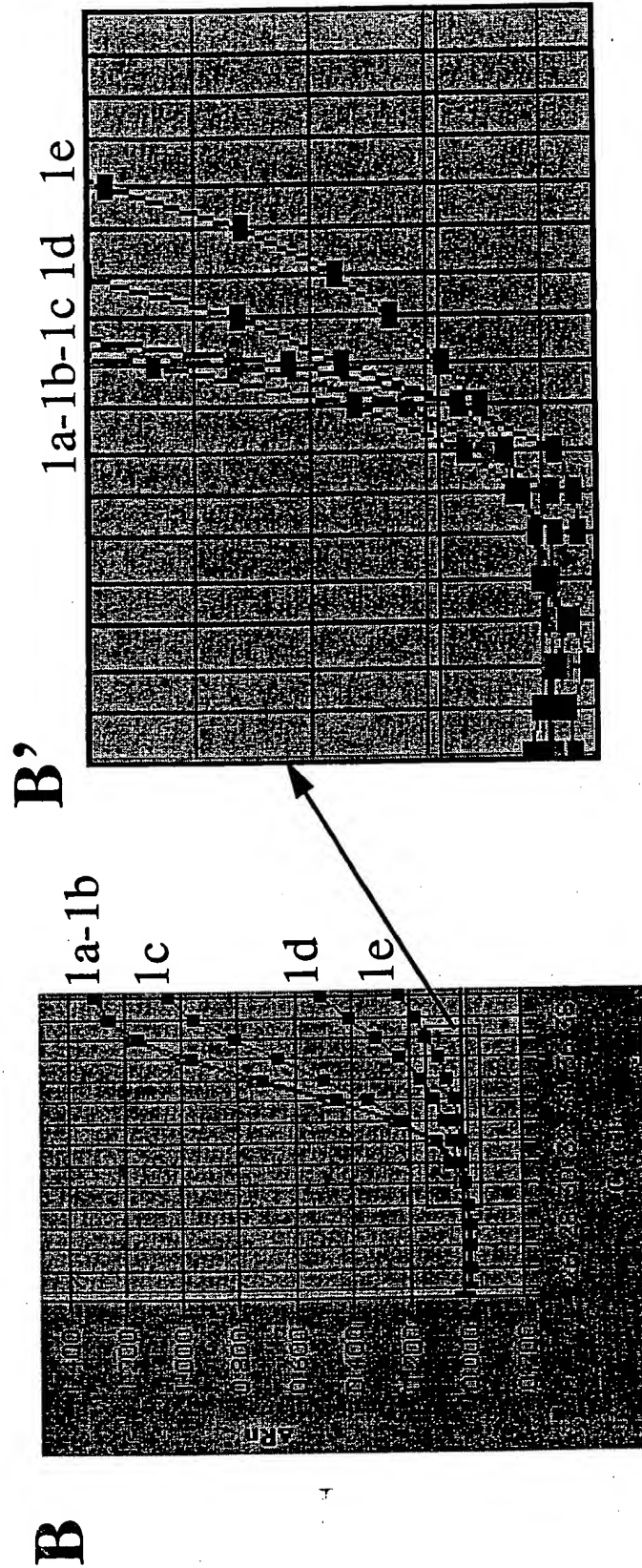


Fig. 4

MI98A00249.1

